

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
METALOPROTEASA HEMORRÁGICA DEL VENENO DE
LA SERPIENTE DEL PERÚ *Bothrops pictus* (Tschudi,
1845) "Jergón de la Costa"**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo, Genetista Y Biotecnólogo

AUTOR

Candy Christie Bellido More

ASESOR

Armando Yarlequé Chocas

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
METALOPROTEASA HEMORRÁGICA DEL VENENO DE
LA SERPIENTE DEL PERÚ *Bothrops pictus* (Tschudi,
1845) "Jergón de la Costa".**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO, GENETISTA Y
BIOTECNÓLOGO

Bach. CANDY CHRISTIE BELLIDO MORE

Lima – Perú

2014

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. ANTECEDENTES	7
V. MATERIALES Y MÉTODOS	13
VI. RESULTADOS	22
VII. DISCUSIÓN	26
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
X. TABLAS Y FIGURAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura N°1 <i>Bothrops pictus</i> , "Jergón de la Costa"	54
Figura N°2 Primer paso de purificación empleando cromatografía de filtración molecular Sephadex G-75	55
Figura N°3 Segundo paso de purificación empleando cromatografía de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-50	56
Tabla N°1 Purificación de la metaloproteasa hemorrágica aislada	57
Figura N°4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 10% de la metaloproteasa hemorrágica aislada	58
Figura N°5 Zimograma sobre gelatina al 2% de la metaloproteasa hemorrágica aislada	59
Figura N°6 Actividad hemorrágica de la metaloproteasa hemorrágica aislada del veneno de <i>Bothrops pictus</i>	60
Figura N°7 Determinación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) de la metaloproteasa hemorrágica aislada	61
Tabla N°2 Efecto de inhibidores y activadores sobre la metaloproteasa aislada	62
Figura N°8 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de la metaloproteasa hemorrágica	63
Figura N°9 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la metaloproteasa	64
Figura N°10 Antigenicidad de la metaloproteasa hemorrágica	65
Figura N°11 Neutralización de la actividad hemorrágica de la metaloproteasa	66

ABREVIATURAS

ASB:	Albúmina sérica bovina
DEAE:	Dietilaminoetil
DHM:	Dosis hemorrágica mínima
DMC:	Dimetil caseína
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
PAGE-SDS:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
PBS:	Buffer fosfato salino
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SVMP:	Snake venom metalloproteinase (traducción al español, <i>metaloproteinasa de veneno de serpientes</i>)
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	Tetrametiletilendiamina

DEDICATORIA

A Dios por permitirme seguir adelante y haber desarrollado este trabajo y por mantenerme con vida al lado de mis seres queridos. Gracias.

A mis padres por todo su apoyo, amor, confianza e impulsarme siempre a continuar con mis metas.

A mis hermanos Jacky, Christopher y Stephanie por creer siempre en mí, y por su apoyo.

Y a mi sobrino Bryan por hacer mis días más felices y divertidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarlequé por sus enseñanzas, confianza y asesoría en la realización de la presente tesis.

A la Blga. Elena Arbaiza y Blgo. Jesús Córdova por su colaboración y brindarme parte de su experiencia con la finalización de este trabajo.

A la Mg. Edith Rodríguez y Mg. Fanny Lazo por sus consejos y colaboración en la realización de esta tesis.

Al Mg. Dan Vivas, Mg. Gustavo Sandoval, Mg. Rocío Inga y Blgo. Julio Mendoza por compartirme sus conocimientos que ayudaron a la obtención de este trabajo.

A mis compañeros y amigos Frank Huari, Julio Delgadillo, Edgar Gonzales, Mercedes Palomino, Marilyn Suárez por acompañarme durante toda mi etapa de preparación académica y apoyo en la realización de esta tesis.

A César Ortiz Rojas por toda su confianza, comprensión y apoyo durante el desarrollo de esta tesis y mi vida profesional.

RESUMEN

Los venenos de serpientes del género *Bothrops* tienen como característica la presencia de enzimas proteolíticas, cuya acción biológica es muy variada y que contribuye con la aparición de hemorragias, desórdenes en la coagulación y necrosis. El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar una de las enzimas proteolíticas presentes en el veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus* (Serpentario "Oswaldo Meneses"-UNMSM). El veneno fue resuspendido en buffer Acetato de amonio 0,1 M pH 5 y se purificó mediante dos pasos cromatográficos sobre Sephadex G-75 y DEAE Sephadex A-50. La enzima fue purificada 1,73 veces con un rendimiento del 1,2% y por PAGE-SDS se obtuvo una sola banda proteica de 62 kDa en condiciones no reductoras. Asimismo, con el mismo peso molecular se observó una banda de digestión sobre los geles de poliacrilamida con gelatina. En relación a la actividad biológica, se determinó que la dosis hemorrágica mínima (DHM) para la enzima purificada fue de 0,226 µg, es decir con un aumento de 2,4 veces la actividad hemorrágica del veneno crudo. La enzima fue termoestable hasta los 55 °C y presentó un pH óptimo de 7,5. Además, se mostró que la enzima fue fuertemente inhibida por EDTA, 2β-mercaptoetanol y DTT siendo dependiente de los iones zinc y magnesio. La enzima fue totalmente neutralizada por el suero botrópico polivalente (INS-Perú) y mostró antigenicidad mediante el ensayo de inmunodifusión.

Palabras clave: Serpiente, veneno, *Bothrops pictus*, metaloproteasa, hemorragia, proteolítica.

ABSTRACT

The venoms of genera *Bothrops* have as characteristic the presence of proteolytic enzymes whose biological action is varied and contributing to the occurrence of bleeding, coagulation disorders and necrosis. The aim of this study was to purify and characterize one of the proteolytic enzymes present in the venom of *Bothrops pictus* Peruvian snake (Serpentarium "Oswaldo Meneses" - UNMSM). Venom was resuspended in Ammonium acetate buffer 0,1 M pH 5 and passed through two chromatographic steps on Sephadex G-75 and DEAE Sephadex A-50. The enzyme was purified 1,73 times with a yield of 1,2 % and by SDS-PAGE a single protein band of 62 kDa was obtained in conditions not reduced, with the same molecular weight band of digestion on polyacrylamide gels was observed with gelatin. Concerning the biological activity, it was determined a Minimum hemorrhagic dose (MHD) for enzyme of 0,226 ug, i.e. an increase of 2,4 times the hemorrhagic activity of the venom. The enzyme was thermally stable up to 55 °C and had a pH optimum of 7,5. Furthermore, it showed that the enzyme was strongly inhibited by EDTA, 2β-mercaptoethanol and DTT being dependent on zinc and magnesium ions. The enzyme was completely neutralized by the polyvalent serum bothropic (INS-Peru) and showed antigenicity by immunodiffusion test.

Keywords: Snake, venom, *Bothrops pictus*, metalloprotease, hemorrhage, proteolytic.

INTRODUCCIÓN

El veneno de serpiente es una mezcla altamente compleja que contiene varias proteínas, principalmente enzimas, así como nucleótidos, iones metálicos y pigmentos (Koh et al., 2006), los cuales en conjunto ocasionan el cuadro de envenenamiento ofídico.

Dentro de la familia Viperidae, el género *Bothrops* es el más representativo en América del Sur y Central. La sintomatología general del envenenamiento producido por las especies de este género es la de originar efectos locales que incluyen edema, dolor, hemorragia, necrosis e infiltración de leucocitos (Fox y Serrano, 2010; Teixeira et al., 2009; Fernandes et al., 2006) en tanto que, los efectos sistémicos incluyen coagulopatías, hemorragia sistémica, nefrotoxicidad y cardiotoxicidad, lo cual puede conllevar a la muerte de la víctima (Gutiérrez et al., 2010; Fernandes et al., 2006). Estos efectos son causados principalmente por metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas, desintegrinas, lectinas, entre otras proteínas.

Actualmente se sabe que aproximadamente el 30% del contenido del veneno de los vipéridos estudiados son metaloproteasas, por lo que estas enzimas estarían ligadas al proceso de envenenamiento, en particular al efecto hemorrágico así como la degradación de proteínas tisulares y plasmáticas (Takeda, et al., 2012). Los estudios sobre la hemorragia causada por la mordedura de vipéridos, indica que se trata de uno de los efectos más severos ya que se originan daños irreversibles en el tejido vascular, lo que posteriormente conduce a la necrosis.

Dentro del proceso de envenenamiento también pueden surgir complicaciones adicionales, las cuales dan lugar a la generación de isquemia local y disminución de la capacidad regenerativa del tejido afectado (Gutiérrez, et al., 2010). Asimismo, a nivel

sistémico se dañan múltiples órganos y se pueden originar “shock” cardiovascular, sangrado pulmonar y afectar el sistema nervioso central (Warrell, 1996; Otero, et al., 2002).

A la fecha, se sabe que todas las toxinas hemorrágicas de los venenos de vipéridos son metaloproteasas, éstas son enzimas con pesos moleculares entre 20 y 100 kDa (Stroka, et al., 2005) con un amplio rango de actividad proteolítica y muestran ser dependientes de los iones zinc, los cuales forman parte de su estructura, por ello son inhibidas por agentes quelantes (Bjarnason y Fox, 1994; Escalante, et al., 2000, Fox y Serrano, 2010).

Teniendo en cuenta la actual clasificación de las metaloproteasas ofídicas de acuerdo a la organización de sus dominios, ellas pertenecen a las clases PI, PII y PIII. La habilidad para producir hemorragia durante el proceso de envenenamiento es atribuida a las tres clases de metaloproteasas, sin embargo, la clase PIII es la que presenta mayor actividad hemorrágica (Fox y Serrano, 2010). Así también, investigaciones realizadas en la última década señalan que las metaloproteasas hemorrágicas pueden tener otras actividades funcionales, tales como acción apoptótica e inhibición de la agregación plaquetaria (Kamiguti, 2005; Laing y Moura da Silva, 2005; Sánchez, et al., 2010), por lo que se están usando como herramienta para evaluar y tratar los eventos trombóticos que a menudo participan en la enfermedad cardiovascular y cerebrovascular (Michelson, 2010). Así mismo, estas enzimas constituyen principios bioactivos de uso potencial para la preparación de fármacos con acción anti-inflamatoria y anti-tumoral (Minea et al., 2005; Markland, 2013; Calderon, et al., 2014).

La serpiente *Bothrops pictus* (Tschudi, 1845), conocida con el nombre de “jergón de la costa”, es una especie endémica del Perú cuya distribución comprende los

departamentos de Lima, Ancash, La Libertad y parte de los departamentos de Huancavelica y Ayacucho. Esta serpiente es responsable de los accidentes ofídicos en la costa central y sur del Perú, teniendo una prevalencia del 100% (Lama, 1990).

Bothrops pictus se caracteriza por ser de color gris claro con manchas en el dorso, de color violeta negruzca, cabeza triangular, con manchas pardas, escamas pequeñas y presenta un vientre blanquecino. Además, es de tamaño pequeño, pudiendo alcanzar un máximo de 100 cm (Olascoaga, 1987). Asimismo, esta especie se caracteriza por producir poco veneno, pudiendo descargar hasta 0,37mL en cada mordedura (Málaga et al., 1993). El hábitat de este animal se viene restringiendo progresivamente debido al crecimiento de las poblaciones humanas y a la conversión de zonas rurales en urbanas, lo que ha llevado a catalogarla desde el año 2004, como una especie en situación vulnerable (Lista de especies amenazadas de fauna silvestre, Decreto Supremo N° 034-2004-AG).

En un estudio realizado por Olascoaga (1987), a partir del veneno completo de *B. pictus*, se determinaron diferentes actividades tales como, actividad proteolítica, fosfolipásica, hemorrágica, edematizante, entre otras. Recientemente, Kohlhoff en el año 2012, empleando métodos proteómicos determinó la presencia de aproximadamente ocho metaloproteasas en el veneno de esta serpiente. Sin embargo, poco se sabe aún sobre los factores hemorrágicos presentes en este veneno, ya que hasta la fecha no se ha aislado ninguna metaloproteasa que presente este efecto hemorrágico.

Por todo lo indicado, las metaloproteasas hemorrágicas comprenden un grupo de principios activos de gran interés científico no solo porque su purificación y caracterización permitirá entender mejor el mecanismo de envenenamiento que origina en particular la serpiente *Bothrops pictus*, sino también porque, estudios de este tipo

serán de utilidad para el desarrollo de nuevos antivenenos, que neutralicen esta actividad que como ya se mencionó puede generar cuadros muy graves e incluso la muerte en las personas accidentadas.

Por tanto, el objetivo de la presente tesis fue evaluar la presencia de metaloproteasas hemorrágicas del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus* y caracterizar la de mayor actividad hemorrágica desde el punto de vista bioquímico y biológico.

ANTECEDENTES

El interés por conocer la composición de los venenos de las serpientes se inicia en el año 1660, cuando se tenía información incipiente sobre algunos venenos en cuanto a sus posibles efectos medicinales, así como los síntomas que producían durante el proceso de envenenamiento; sin embargo, se desconocía aún su composición química. Ya en el año 1881, en un estudio que se centró en las especies botrópicas, se dio el primer indicio de que los venenos de las serpientes tienen acción proteolítica, lo que se pudo observar en la especie *Bothrops atrox* (Porges, 1953). Con el paso de los años se pudo determinar que efectivamente los venenos de las serpientes tienen naturaleza proteolítica, tal como lo evidenció Deutsch, et al., en el año 1955 trabajando con diversos especímenes de Brasil y Norteamérica y en cuyo trabajo se probaron, además distintos tipos de sustratos para estas enzimas tales como fibrina, fibrinógeno, gelatina, entre otros. Asimismo, se determinó que los venenos podían contener varias proteasas algunas de ellas específicas para un tipo de sustrato.

Luego de estos hallazgos se vio la necesidad de purificar estas proteasas para poder distinguirlas y diferenciarlas. Es así que en 1960, un grupo de investigadores japoneses logró purificar varias proteasas del veneno de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis*, las cuales fueron altamente inhibidas con el agente quelante EDTA, demostrándose así que se trataban de proteasas con contenido de metales, de donde vino su denominación como metaloproteasas (Maeno, 1960; Ohsaka, 1960; Okonogi, 1960).

A partir de esos estudios, se inician los trabajos de purificación de proteasas de origen ofídico, siendo la primera proteasa con acción hemorrágica purificada la denominada HR-II, proteasa aislada del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Iwanaga, 1965)

que habita en Europa del Este y Asia, habiéndose establecido sus principales características bioquímicas. Posteriormente, Bjarnason y Tu (1978) aislaron cinco proteínas hemorrágicas del veneno de la serpiente *Crotalus atrox* y evaluaron su actividad empleando agentes como la o-fenantrolina un agente quelante que inhibe la actividad hemorrágica así también determinaron, por espectroscopia de absorción atómica, la presencia de metales como el zinc que se encuentra en una relación 1:1 con la proteína en estudio, siendo uno de los primeros reportes que demuestra la presencia de metales asociados a la estructura proteica y la concentración en la que se encuentran en estas metaloproteasas hemorrágicas.

Una controversia que surgió acerca de la actividad de estas proteínas se originó en publicaciones que señalaban la existencia de factores hemorrágicos carentes de actividad enzimática (Omori, 1962; Escobar, 1992). Sin embargo, a la fecha se ha establecido de modo contundente que todos los factores hemorrágicos aislados son metaloproteasas y que la aparente falta de actividad enzimática se debe a la naturaleza o sensibilidad de la técnica que se empleó para hacer la detección de la actividad (Fox y Serrano, 2010).

Durante el tiempo en que se fueron encontrando nuevas proteasas, se fue comprendiendo mejor como es que actúan estas proteínas durante el envenenamiento y conociendo que la hemorragia es el principal efecto local producido. Estas enzimas tendrían un importante rol especialmente en el inicio del proceso de envenenamiento, donde producen alteraciones en las células endoteliales, las cuales se presentan en forma de proyecciones citoplasmáticas producido por extravasación lo que estaría asociado con hemorragia en los vasos capilares (Gutiérrez, 2005; Fox y Serrano, 2010). Se utilizaron diferentes técnicas para determinar la actividad enzimática y la actividad hemorrágica de las metaloproteasas, sin embargo no fue hasta los años 80 en que se

pudo determinar la estructura primaria de estas enzimas proteolíticas mediante el empleo de métodos de secuenciamiento peptídico desarrollados hasta ese entonces (Shannon, 1989 y Miyata, 1989), posteriormente, se comenzaron a realizar los secuenciamientos nucleotídicos, siendo la primera metaloproteasa hemorrágica secuenciada la ht-e de la serpiente *Crotalus atrox* (Hite, 1992).

Las metaloproteasas fueron clasificadas en un inicio sólo en base a sus pesos moleculares indicándose, dos clases: alto y bajo (Bjarnason y Fox, 1983). Con el avance de las investigaciones, en 1994, Bjarnason y Fox reclasificaron a las metaloproteasas en cuatro clases que fueron: PI, PII, PIII y PIV, basándose en la presencia o ausencia de algunos dominios diferentes al dominio metaloproteasa, a partir de la secuencia obtenida del ADN complementario de los venenos de serpientes (Bjarnason y Fox, 1994). Sin embargo, la clasificación actual realizada el 2008 por Fox y Serrano se basa tanto en la presencia o ausencia de los dominios no proteolíticos como en los productos liberados, considerándose sólo tres clases, que son PI, PII y PIII, la clase PI es la más simple ya que sólo presenta el dominio metaloproteasa; la clase PII tiene tanto el dominio metaloproteasa y el dominio desintegrina y la clase PIII presenta los dominios metaloproteasa, similar a desintegrina y rico en cisteína; esta clase PIII está actualmente dividida dentro de las subclases IIIa - IIIId (Fox y Serrano, 2008).

metaloproteasa hemorrágica de 23 kDa que mostró tener una elevada actividad enzimática (Sánchez, et al., 2010), la tercera, correspondería a una metaloproteasa de la clase PIII de 50 kDa (Lopez Lozano, et al., 2002) cuya actividad hemorrágica fue mayor que la atroxlisina, y la cuarta pertenece a la clase PI que corresponde a la Batroxasa (Cintra, et al., 2012), con un peso molecular de 22,9 kDa y posee actividad hemorrágica.

De la misma forma, ya se han aislado las metaloproteasas de las especies sudamericanas *Bothrops leucurus*, de la cual se purificaron la leucurolisina-A (Gremski, et al., 2007) y la leucurolisina-B (Sánchez, et al., 2007), *Bothrops lanceolatus* (Stroka, et al., 2005), *Bothrops neuwiedi* (Rodrigues, et al., 2000), *Bothrops jararacusu* (Mazzi, et al., 2004), *Bothrops asper* (Gutierrez, et al., 1995), entre otras. Asimismo, del veneno de *Bothrops brazili* de la zona de Alto Marañón del Perú, se ha aislado una metaloproteasa de 20 kDa (Azañero, 2000) en la cual se le determinó posteriormente una baja acción hemorrágica (Isla, 2003). Con relación al veneno de *Bothrops pictus*, serpiente endémica (Ascencios, 1995) y de mayor relevancia en salud pública en la costa peruana (Maguiña, et al., 1998) se ha identificado la presencia de algunas enzimas como la enzima similar a trombina (Mesia, 2011), fosfolipasa A₂ (Olascoaga, 1987), L-aminoácido oxidasa y proteasa (Cortéz, 1997), demostrándose también sus efectos biológicos tales como hemorragia y hemólisis. En relación a las metaloproteasas, Cortéz (1997) aisló una proteína de 50 kDa mediante dos pasos cromatográficos, Sephadex G-200 y DEAE Sephadex A-50, demostrando que dicha proteína presenta entre otras características, acción fibrinogenolítica; sin embargo, esta enzima no mostró actividad hemorrágica. No obstante, otros autores han reportado una alta actividad hemorrágica en el veneno crudo de esta especie (Olascoaga 1987; Rojas et al., 2005). Recientemente, Kohlhoff et al., en el año 2012 determinaron mediante un estudio proteómico la presencia de distintas

metaloproteasas de la clase PIII en este veneno, las cuales son fuertemente hemorrágicas.

Por tanto, en el presente trabajo se pretende aislar y caracterizar una metaloproteasa del veneno de *Bothrops pictus* que presente acción hemorrágica elevada con respecto al veneno crudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

1.1. Veneno

Se empleó veneno obtenido de especímenes adultos de *Bothrops pictus*, procedentes de la localidad de Canta, departamento de Lima, mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Figura 1).

El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas, centrifugado a 3000 rpm, liofilizado y mantenido a 4 °C hasta su uso.

1.2. Antiveneno

Se utilizó el antiveneno botrópico polivalente de origen equino Lote N° 00300078 producido por el Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú, al estado líquido en ampollas de 10 mL y mantenidos a 4°C. El antiveneno empleado contiene inmunoglobulinas IgG contra el veneno de las serpientes: *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrocophias hyoprora*.

1.3. Animales experimentales

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C de 18 a 22 g adquiridos del bioterio del Instituto Nacional de Salud, los cuales fueron mantenidos durante los

ensayos en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2. Material de Laboratorio

2.1. Sustratos

- Caseína (Sigma Chemical Company)
- Gelatina (Sigma Chemical Company)

2.2. Buffers

- Buffer Tris-HCl 0,2 M pH 7,0 a 10,0
- Buffer Acetato de Amonio 0,1 M pH 5,0
- Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4
- Buffer muestra no reductor 2x (Tris 0,06 M, SDS 0,05 %, glicerol 10 % v/v, azul de bromofenol 0,05 %)
- Buffer de corrida electroforética 10x (Tris 0,25 M, Glicina 1,9 M, SDS 1% p/v)
- Buffer del gel separador 4x (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8)
- Buffer del gel compactador 4x (Tris-HCl 1 M, pH 6,8)

2.3. Estándar de peso molecular

Se empleó el marcador de peso molecular Wide-View™ Prestained Protein Size Marker II de la marca Wako (Japón) que muestran los siguientes pesos

moleculares: 7 kDa, 14 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 140 kDa y 240 kDa.

2.4. Electroforesis

Acrilamida, bis acrilamida, tetra etil metilen diamina (TEMED), persulfato de amonio, azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol y sodio dodecil sulfato (SDS) de Sigma Chemical Company, USA.

2.5. Cromatografía

Se emplearon columnas cromatográficas de filtración molecular con Sephadex G-75 y de intercambio aniónico con DEAE Sephadex A-50.

2.6. Agentes modificadores de la actividad enzimática

- Ditioneitol (DTT)
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)
- Mercaptoetanol
- CaCl_2
- MgCl_2
- ZnCl_2

2.7. Otros

- Ácido Tricloroacético
- Agarosa

- Folin Ciocalteu
- Glicerina
- Glicina
- Solución decolorante (Metanol, etanol, ácido acético y agua en proporción 4:2:1:13)
- Solución alcalina (tartrato de Na y K al 4%, carbonato de Na al 3%, sulfato de cobre al 2%, en relación 100:1:1, respectivamente)
- Tritón X-100

2.8. Equipos

- Balanza analítica, Ainsworth.
- Liofilizador Labconco.
- Baño de temperatura regulable, Memmert.
- Equipo de electroforesis en placa vertical, Sigma Techware.
- Espectrofotómetro UV, Shimadzu.
- Fotocolorímetro, Spectronic Bausch & Lomb.
- Fuente de poder para electroforesis, Duostat Beckman.
- Potenciómetro digital, Amalab 6x10

3. MÉTODOS

3.1. Cuantificación de proteínas.

La cantidad de proteína se calculó midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm (Warburg y Christian, 1941), y por el método de Lowry *et al.*, (1951), modificado en este laboratorio por Loayza *et al.*, (1985) empleando albúmina

sérica bovina como proteína estándar en el rango de 10 a 50 µg. Para el ensayo se preparó una batería de tubos que contenían una mezcla de 2 mL de solución alcalina (Carbonato de Na 3%, en NaOH 0,1 N; Tartrato de Na y K 4% y Sulfato de Cu 2%) con 0,5 mL de muestra a distintas concentraciones, se incubó la mezcla por 15 minutos a 37 °C, luego se adicionó 0,5 mL de Folin Ciocalteus 1:6 y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. La reacción fue leída en el fotolorímetro a 660 nm.

3.2. Purificación de la metaloproteasa

Se emplearon 50 mg de veneno liofilizado de *Bothrops pictus* disueltos en buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5, previa centrifugación a 3000 rpm para eliminar los restos insolubles. El sobrenadante obtenido fue aplicado a una columna de filtración molecular (volumen de columna 46 mL) sobre Sephadex G-75 previamente equilibrada con el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 1 mL a una velocidad de flujo de 8 mL/hora monitoreándose la cantidad de proteína por absorbancia UV a 280 nm, así como también la actividad proteolítica empleando caseína al 1%. Las fracciones que presentaron actividad proteolítica fueron juntadas y concentradas hasta un volumen de 1,5 mL y posteriormente, se le sometió a un segundo paso cromatográfico de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 con un volumen de columna de 29,8 mL, previamente equilibrado con el mismo buffer del primer paso. Se colectaron fracciones de 1 mL a una velocidad de flujo de 8 mL/hora midiéndose la actividad proteolítica tanto en el primer volumen (isocrático) como en el segundo y tercer volumen eluidos con NaCl 0,3 M y 0,6 M, respectivamente. Las fracciones que presentaron actividad proteolítica fueron dializadas en el mismo buffer con el que se realizó la elución para luego ser evaluadas *in vivo* mediante el ensayo de

actividad hemorrágica, para posteriormente ser juntadas para su ulterior caracterización bioquímica y biológica.

3.3. Peso molecular

Las fracciones purificadas por este método con actividad enzimática fueron evaluadas mediante electroforesis PAGE-SDS sobre geles de acrilamida al 10% con SDS (Laemmli et al., 1970), a los que también se agregaron marcadores de peso molecular. La corrida electroforética se realizó durante 1 hora a un voltaje constante de 100 V empleando como buffer de corrida Tris-glicina-SDS 10X (Tris 0,25 M, glicina 1,9 M y SDS 1% p/v). Luego, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie 0,05%. Después de 1 hora se lavaron con la solución decolorante (metanol 20%, etanol 10%, ácido acético 5%) por aproximadamente 12 horas. De esta manera se pudieron visualizar las bandas electroforéticas tanto del veneno como también de la metaloproteasa.

3.4. Actividad Proteolítica

3.4.1. Actividad sobre caseína

Se empleó el método de Takahashi y Osaka (1970), estandarizado en este laboratorio (Rodriguez, E. y Yarlequé, A., 1991). Para eso, se usó 1ml de caseína al 1% en buffer Tris HCl 0,2M pH 8,5 y 0,1ml de cada fracción purificada ó 0,05 ml de veneno en estudio. La mezcla de reacción se incubó durante 10min a 37°C, deteniéndose la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 0,44M en frío por 30 minutos. Luego se procedió a centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos y finalmente se midió la actividad por la formación de productos ácidos solubles a 280 nm. La actividad específica fue calculada

convirtiendo los valores de D.O 280 nm a μg de L-tirosina medida a 660 nm (Lowry, 1951) y expresada en unidades de actividad/mg de proteína.

3.4.2. *Actividad sobre gelatina*

Se evaluó por el método de Zimograma sobre caseína, para ello se prepararon geles de poliacrilamida al 10% con SDS incluyendo en la mezcla gelatina a concentración final de 0,5% y en los pocillos de los geles se aplicaron las muestras de veneno o de la enzima en estudio diluida en el buffer de muestra. Los geles se corrieron en una cámara electroforética vertical por 1 hora a voltaje constante de 100V. Luego los geles fueron puestos en solución acuosa de Tritón X-100 al 2,5% por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante para retirar el SDS y posteriormente, los geles fueron incubados en buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,5 a 37°C por 20-22 horas. Finalmente se procedió al teñido con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,05% y las bandas de digestión se revelaron empleando la solución decolorante (Antunes, et al., 2010).

3.5. *Actividad Hemorrágica*

Se determinó de acuerdo al método de Kondo et al., (1960) y siguiendo las adaptaciones de Isla, M. (2003), para lo cual se inyectó 100 μL de veneno o de la proteína en estudio diluidas en buffer fosfato a ratones albinos (18-20 g) por vía subcutánea. Luego de dos horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les removió la piel observando por el lado interno para calcular el diámetro del área hemorrágica. La dosis hemorrágica mínima (DHM)

es la cantidad de veneno capaz de inducir un área hemorrágica de 10 mm de diámetro (Kondo et al., 1960).

3.6. *Propiedades bioquímicas de la metaloproteasa*

3.6.1. Efecto de Inhibidores e activadores

Se mezclaron 100 μ l de la proteína en estudio y 100 μ l del agente activador (CaCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2) a la concentración de 5 mM o del agente inhibidor (EDTA, DTT, 2- β mercaptoetanol) a la concentración de 5 mM, incubándose a 37°C por 10 minutos. Luego, se tomaron alícuotas de 50 μ l de la mezcla para la prueba de actividad proteolítica sobre caseína con un tiempo de incubación de 10 minutos. Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.6.2. Determinación del pH óptimo

Se calculó utilizando buffer Tris HCl 0,2 M en un rango de 7,0 a 9,0 empleando 25 μ l de la enzima y luego, se midió la actividad proteolítica sobre caseína. Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.6.3. Termoestabilidad

Se determinó empleando preincubados de la enzima a diferentes temperaturas de 37 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C y 85 °C por 10 minutos. Luego, se midió la actividad proteolítica sobre caseína de los preincubados. Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.7. Ensayos inmunológicos

3.7.1. Inmunodifusión

Se realizó sobre geles de agarosa al 1%. Para ello, la agarosa fue disuelta en buffer fosfato 0,15 M pH 7,4 por calentamiento a 100 °C por 1 minuto y 3 ml de esta solución, se extendieron en una lámina portaobjetos y se dejó enfriar durante 10 minutos. Luego, se excavaron tres pocillos equidistantes, colocándose en el pocillo central 3 µl de suero antibotrópico y en los pocillos laterales se colocaron 3 µl de la enzima purificada, 3 µl de albúmina sérica bovina (ASB) (4 mg/ml) y 1 µl de veneno crudo, respectivamente. La difusión se llevó a cabo en una cámara húmeda a 4 °C durante 72 horas. Luego, las láminas se lavaron con buffer fosfato pH 7,4, procediendo a teñirlas con azul brillante de Coomassie al 0,05%, decolorándose con la misma solución decolorante empleada para electroforesis hasta que se puedan evidenciar los arcos de precipitación (Ouchterlony y Nilsson, 1978).

3.7.2. Neutralización *in vivo*

Se preincubaron 5 DHM de la enzima purificada y 5 DHM del veneno crudo con ½, 1 y 2 dosis de antiveneno botrópico polivalente (INS) por 1 hora a 37 °C. Luego, se tomó 0,1 mL del preincubado y se inyectó por vía subcutánea a ratones albinos para medir la actividad hemorrágica (Isla, 2003). La dosis de neutralización del suero antibotrópico del Instituto Nacional de Salud (INS)-Lima indica que 10 mL del antiveneno botrópico polivalente neutralizan 25 µg de veneno botrópico.

RESULTADOS

1. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína determinada por la medida de la absorbancia de luz UV a 280 nm para 1 mg/ml del veneno de *Bothrops pictus* fue de 1,12 mg/ml. Mientras que, por el método de Lowry, se calculó que la cantidad de proteína para 1 mg de veneno fue 0,66 mg, es decir el 66% del peso total del veneno.

2. Purificación de la metaloproteasa hemorrágica

El primer paso de purificación empleando una columna de filtración molecular Sephadex G-75, reveló cuatro picos de proteínas (Figura 2). El primer pico de proteína coincide con el primer pico de actividad proteolítica. Asimismo, en el segundo pico también aparece la actividad proteolítica, la cual coincide con la caída de dicho pico de proteína. La actividad proteolítica localizada en el primer pico fue seleccionada para este estudio.

El segundo paso de purificación con una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A-50, dio lugar a la aparición de pequeños picos de proteína en el volumen isocrático. Al aplicar NaCl 0,3M, se registraron 2 picos de proteínas y luego con NaCl 0,6 M, se liberó un pico adicional de proteína (Figura 3). La actividad proteolítica sólo se encontró en el primer pico del volumen eluido con NaCl 0,3 M, el cual contenía a su vez, actividad hemorrágica.

Con estos dos pasos de purificación se pudo obtener la enzima con un factor de purificación de 1,73 veces y un rendimiento de 1,2% (Tabla 1).

3. *Peso molecular*

Mediante PAGE-SDS, la enzima purificada mostró un peso molecular de 62 kDa en condiciones no reductoras (Figura 4).

4. *Actividad Proteolítica y hemorrágica*

Mediante el método de actividad proteolítica sobre caseína, se encontró que la enzima purificada poseía 74,1 U/mg de actividad específica que es 1,73 veces mayor que la actividad específica del veneno crudo (Tabla 1). Asimismo, cuando se evaluó la actividad proteolítica sobre geles de poliacrilamida con gelatina 2% se encontró una banda de digestión que coincidía con el peso de la enzima en estudio (Figura 5).

Por otro lado, la actividad hemorrágica encontrada correspondió a una DHM de 0,226 µg para la enzima purificada (Figura 6 y 7), y de 0,535 µg para el veneno crudo, lo que equivale a una elevación de la potencia hemorrágica de 2,4 veces.

5. *Propiedades bioquímicas de la enzima*

5.1. *Inhibidores y activadores*

Con este ensayo se obtuvo que el EDTA 5mM produjo una inhibición de la actividad proteolítica sobre caseína del 45,29 %, el 2β-mercaptoetanol 5 mM una inhibición del 67,4 % y el DTT 5mM un 69,2 % de inhibición (Tabla 2).

De la misma forma, se observó que entre los iones evaluados, el Zn^{2+} y el Mg^{2+} produjeron un valor semejante de actividad al de la enzima (102%) y una ligera activación (112%), respectivamente. Por su parte, el Ca^{2+} registró una actividad del 95%, es decir prácticamente el mismo valor de la enzima sin el ion (Tabla 2).

5.2. *pH óptimo*

La enzima tuvo actividad en todo el rango evaluado desde pH 7 hasta pH 9. Siendo los valores extremos a pH 7 (92.3%) y pH 9 (46.2%), con un valor máximo (100%) a pH 7.5 (Figura 8).

5.3. *Termoestabilidad*

Se observó que la actividad proteolítica de la metaloproteasa sobre caseína desciende desde el 100% a 37 °C, a 82.6% (45 °C), 30.4% (55 °C), 17.8% (65 °C) y 0% a partir de 75 °C (Figura 9).

6. *Ensayos inmunológicos*

6.1. *Inmunodifusión*

Se observó un reconocimiento del antiveneno botrópico polivalente (INS) sobre la enzima purificada, demostrándose ello por la aparición de una sola línea de precipitina, lo que indicaría que el antiveneno comercial es capaz de identificar la estructura polipeptídica de la enzima en estudio (Figura 10).

6.2. *Neutralización in vivo*

Para 5 DHMs tanto para el veneno crudo como para la enzima purificada, se observó que $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis de antiveneno comercial calentados a 37 °C por una hora fueron capaces de neutralizar la actividad hemorrágica en un 100% (Figura 11).

DISCUSIÓN

Contenido de proteínas

El contenido proteico del veneno de las serpientes es muy variable entre las distintas especies de un mismo género (Chippaux, et al., 1991). En el género *Bothrops* se ha observado claramente esta variación. En el 2008, Mendoza, et al., determinaron el contenido proteico para cuatro especies de este género obteniendo que por el método de Lowry las especies *Bothrops atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili* y *B. pictus* tienen un contenido proteico de 78%, 74%, 83% y 69%, respectivamente. Asimismo, Yarlequé M, en el 2012 encontró que los venenos de *Bothrops atrox* y *B. pictus* tuvieron un contenido proteico de 68% y 66%, respectivamente. Estos resultados junto con el mostrado por Cárdenas en 1993 en el cual mostró un contenido proteico de 63% y el obtenido en el presente trabajo de 66% para *B. pictus*, se puede indicar que este veneno posee un menor contenido proteico comparado con las especies antes mencionadas del mismo género.

Estas diferencias en el contenido se deben a que el veneno ofídico contiene en su mayoría proteínas y en menor cantidad algunos iones metálicos, nucleótidos, entre otros, y en el cual las proteínas son las que pueden inmovilizar o causar daño local y sistémico que conducen a la muerte de la presa y permitir su digestión, es decir que el contenido proteico va a depender del requerimiento de la serpiente para poder cazar, lo que puede ser afectado por la presa o por el mismo ambiente (Chippaux, 1991).

Purificación de la enzima

Desde que se inició la investigación en venenos de serpientes, se ha tenido un amplio interés por conocer la acción de cada uno de sus componentes, por tal razón se comenzaron a desarrollar métodos de separación entre los cuales uno de los más usados es la cromatografía. Dentro de los principales tipos de cromatografías se encuentran la de filtración molecular, la de intercambio iónico y la de afinidad. Estos métodos cromatográficos han permitido la separación de muchos componentes de venenos ofídicos, como las metaloproteasas, que han sido ampliamente estudiadas debido a que estas enzimas cumplen un rol fundamental durante el proceso de envenenamiento, ya que producen la digestión de proteínas de la matriz extracelular, así como también pueden producir hemorragia. Entre las primeras metaloproteasas purificadas en los venenos de vipéridos, se encuentra el aislado de la serpiente *Agkistrodon halys blomhoffii* (Iwanaga, 1965) que habita en Europa del Este y Asia. A partir de esto, se han logrado identificar y aislar diferentes metaloproteasas, asimismo se ha podido reconocer algunas características propias de cada una de estas enzimas.

La metaloproteasa estudiada en el presente trabajo se logró aislar mediante dos pasos cromatográficos, el primero a través de una cromatografía de filtración molecular sobre Sephadex G-75 en donde se obtuvo una proteína que eluyó en el primer pico proteico, obteniéndose una purificación de 1,3 veces realizando el ensayo proteolítico sobre caseína. El segundo paso fue en una columna de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex A-50 con el que finalmente se pudo obtener la proteína eluida con NaCl 0,3 M coincidiendo con el primer pico proteico eluído con la misma concentración de sal. Esta purificación se realizó basándonos en la purificación parcial realizada por Escobar, et al., (1994) y la purificación total de una proteasa no hemorrágica realizada por Cortéz (1997) realizando dos pasos cromatográficos usando Sephadex G-200 y DEAE Sephadex

A-50 con una purificación de 3,7 veces, evidenciándose en este último trabajo la presencia de otra proteasa la cual no había sido evaluada ya que, aparentemente presentaba baja actividad proteolítica sobre caseína. La metaloproteasa aislada en el presente estudio se realizó empleando un pH de 5, esto para poder evitar la autoproteólisis de la enzima. Asimismo, indicamos que la enzima interactuó a pH 5 con el gel de intercambio aniónico y pudo ser eluida con NaCl 0,3 M, lo cual indica que a este pH la enzima tiene carga negativa, por lo tanto su pI es menor que 5, por lo que se trata de una proteína ácida purificada 1,7 veces y tiene un rendimiento de 1,2% y representó el 0,71% (p/p) del total de proteína del veneno crudo.

Se han purificado diversas metaloproteasas del género *Bothrops*, así en el año 1996, Pantigoso, et al., lograron purificar una proteasa hemorrágica del veneno de *B. atrox* mediante tres pasos cromatográficos: intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50, filtración molecular sobre Sephadex G-50 y recromatografía de filtración molecular sobre Sephadex G-100, indicando un requerimiento de CaCl₂ durante la purificación para optimizar la detección de la misma, con lo que se obtuvo una enzima purificada 7,4 veces. Otra metaloproteasa aislada de este mismo veneno es la denominada atroxlisina-I que fue purificada mediante tres pasos cromatográficos, las dos primeras de exclusión molecular y la tercera por RP-HPLC (Sánchez, et al., 2010), con una purificación de 1,82 veces empleando como sustrato DMC (dimetilcaseína) y un rendimiento de 9,34% y presentó el 5,1% (p/p) del total de proteínas del veneno crudo. Otra especie a partir de la cual se ha aislado una metaloproteasa es *B. brazili*, mediante un paso sobre Sephadex G-100 y un segundo paso sobre CM-Sephadex C-50, obteniéndose una purificación de 3,2 veces y un rendimiento de 52,5% (Azañero, 2000), el cual representa un alto rendimiento comparado con otras proteasas aisladas a partir de venenos de especies de este género. En la especie *B. leucurus* se aisló la leucurolisina B que es una metaloproteasa de la clase PIII purificada por tres pasos cromatográficos de los cuales

dos corresponden a filtración molecular (Sephacryl S-200 y Sephacryl S-300) y uno de intercambio iónico (DEAE SepharoseCL-6B) determinándose un rendimiento del 24,5% y representó el 1,2% (p/p) del total de proteína del veneno crudo (Sánchez, et al., 2007). Un contenido similar a la leucurolisina B se observó en la batroxasa que es una metaloproteasa de bajo peso molecular de la especie *B. atrox* (Cintra, et al., 2012).

De la misma forma se ha logrado purificar distintas metaloproteasas empleando tanto cromatografía de filtración molecular como intercambio iónico en las especies *B. jararaca* (Paine, et al, 1992), *B. jararacussu* (Mazzi, et al., 2004), *B. asper* (Gutierrez, et al., 1995); también en especies de otros géneros se han purificado metaloproteasas, así tenemos que del veneno de *Lachesis muta* se ha purificado una proteasa en tres pasos (Rodriguez y Yarlequé, 1991) y *Trimeressurus flavoviridis* (Takahashi y Ohsaka, 1970). Por lo que, la combinación de ambos pasos cromatográficos ha resultado muy eficiente en el estudios de las enzimas proteolíticas de venenos ofídicos, acompañándolos muchas veces con terceros pasos cromatográficos empleando la técnica de HPLC (Mazzi, et al., 2004, Sánchez, et al., 2010, Cintra, et al., 2012).

Peso molecular

De una forma sencilla se puede clasificar a las metaloproteasas tomando en cuenta su peso molecular. Las de mediano (30-60 kDa) y alto (60-100 kDa) peso molecular corresponderían a la clase PIII y las de bajo (20-30 kDa) a la clase PI o el dominio metaloproteasa de la clase PII, liberado por autoproteólisis (Markland, 2013). La metaloproteasa aislada en este trabajo tiene un peso molecular de 62 kDa en condiciones no reductoras, lo que indicaría que se trata de una enzima de alto peso molecular, que correspondería con una metaloproteasa de la clase PIII; sin embargo no se puede saber la subclase a la cual pertenece ya que para esto se necesitaría realizar la extracción del

ARN a partir de la cual se sintetiza la proteína en estudio. El peso molecular de la metaloproteasa aislada en este estudio correspondería al peso de la enzima en su conformación nativa, es decir que si la enzima fuera sometida a condiciones reductoras ésta se desplegaría debido a los puentes disulfuros que podrían estar presentes en su conformación, lo que conduciría a un retraso en la migración de la enzima.

Distintas metaloproteasas de la clase PIII han sido purificadas. Tenemos que una de las más estudiadas es la metaloproteasa aislada de *Bothrops jararacá* denominada jararagina, que tiene un peso molecular de 52 kDa determinado por electroforesis en PAGE-SDS. En un trabajo posterior empleando la secuencia aminoacídica, se determinó un peso molecular teórico deducido a partir de esta secuencia correspondiente a 47 kDa. Esta diferencia sería debido a la N-glicosilación en el dominio catalítico (Moura-da-Silva, 2012). Sin embargo, esta diferencia es pequeña y estaría sujeta a los cambios postranscripcionales que sufren este tipo de enzimas. Estos resultados junto con los mostrados en otros trabajos señalan a la electroforesis por PAGE-SDS como una técnica simple, confiable para determinar el peso molecular de una proteína aislada.

Asimismo, en el 2012, Kohlhoff, et al., realizaron un estudio proteómico sobre tres especies del género *Bothrops* que habitan en el Perú, *B. atrox*, *B. barnetti* y *B. pictus*; en esta última se encontraron 8 metaloproteasas y se les determinó su masa molecular mediante los métodos de espectrometría de masas con MALDI TOF y electroforesis por PAGE-SDS tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Entre las metaloproteasas encontradas en este veneno se muestran dos con pesos moleculares de 60 kDa y otra de 65 kDa por electroforesis en PAGE-SDS tanto en condiciones reductoras como no reductoras, las cuales se encontrarían cercanas al valor encontrado para la enzima purificada en el presente trabajo.

Entre los venenos del género *Bothrops* se ha encontrado que en su mayoría las metaloproteasas están en el rango de 37 a 75 kDa de peso molecular (Terra, et al., 2009), lo cual puede variar entre especies. En la especie *B. atrox*, se han aislado metaloproteasas de peso molecular bajo (Pantigoso, et al., 1996 y Cintra, et al., 2012) y alto (López Lozano, et al., 2002), que corresponderían a las clases PI y PIII, respectivamente. En *B. pictus*, previamente se había encontrado una metaloproteasa con un peso molecular de 50 kDa bajo condiciones reductoras y no reductoras, por lo que se trataba de una enzima homogénea y unicitenaria y de mediano peso molecular (Cortés, 1997).

En general, se han podido aislar metaloproteasas de mediano peso molecular de 44, 46, 58 y 60 kDa en los venenos de *A. acutus* (Zhu, 1997), *Crotalus atrox* (Pandya y Budzinski, 1984), *Naja nigricolins* (Evans, 1984) y *B. jararacussu* (Mazzi, et al., 2004), respectivamente, que corresponden a metaloproteasas de la clase PIII. A su vez, en otras especies se han aislado metaloproteasas de bajo peso molecular en el rango de 20 a 30 kDa correspondientes a la clase PI, presentes en serpientes como *Trimeresurus flavoviridis* (HR2A), *Crotalus rubber rubber* (HT-2), *B. asper* (BaP1), *Agkistrodon acutus* (Acutolisina A) y *B. moojeni* (BmooMPa-I) (Takahashi y Ohsaka, 1970; Takeya, 1990; Gutierrez, 1995; Liu, 1999 y Bernardes, 2008). Menos frecuente aún es la presencia de metaloproteasas con un peso molecular por encima del rango promedio para las metaloproteasas, entre las más importantes se encuentran la presente en el veneno de *Crotalus atrox* y *Lachesis muta* con pesos moleculares de 93 kDa (Bailey, 1988) y 86 kDa (Escobar, 1992), respectivamente.

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se ha relacionado tanto con las metaloproteasas de clase PI como las de clase PIII, debido a que esta actividad está ligada al dominio catalítico metaloproteasa (M) de la enzima, la cual lo comparten ambas clases. Este dominio media las diferentes funciones atribuidas a las metaloproteasas como degradación de componentes de membrana basal, proteínas de la membrana celular endotelial, así como también tienen como blanco a las proteínas de la coagulación sanguínea y las plaquetas (Kamiguti, 2005; Gutierrez, et al., 2010 y Takeda, et al., 2012).

La actividad proteolítica de la enzima purificada fue evaluada por dos métodos conocidos: la actividad caseinolítica, que tiene como sustrato a la caseína y la zimografía, que emplea a la gelatina como sustrato. La actividad caseinolítica es una de las técnicas que se ha usado ampliamente para la detección de proteasas de venenos de serpientes y que se basa en la detección los ácidos solubles leídos a 280 nm (Takahashi y Ohsaka, 1970; Fox y Serrano, 2010). Se ha determinado la presencia de metaloproteasas empleando esta técnica a partir de los venenos de *Lachesis muta* (Rodríguez y Yarlequé, 1991 y Escobar, 1992), *Bothrops atrox* (Pantigoso, et al., 1996), *B. brazili* (Azañero, 2000), *B. pictus* (Cortéz, 1997), *Trimeresurus flavoviridis* (Takahashi y Ohsaka, 1970). En el presente trabajo se pudo aislar de forma sencilla a otra metaloproteasa de *B. pictus* y empleando esta técnica, se determinó su actividad proteolítica que resultó ser 1.8 veces mayor que la del veneno crudo. Esta enzima mostró una actividad proteolítica menor que la encontrada por Pantigoso, et al., (1996) en la especie *B. atrox* y por Rodríguez y Yarlequé (1991) en *Lachesis muta*.

A su vez, la zimografía sobre gelatina es un método que mide de forma parcial la proteólisis del colágeno, debido a que la gelatina se produce a partir de la desnaturalización del colágeno, lo cual se encontraría altamente relacionado con la degradación de la matriz extracelular (Terra, et al., 2009). Nuestros resultados muestran

actividad proteolítica sobre gelatina, en donde se pudo observar la degradación de la gelatina obtenida por la enzima purificada y que también se observó en el veneno crudo.

En las metaloproteasas se ha evidenciado la presencia de un “*binding pocket*” en el dominio catalítico altamente flexible, lo cual permite que estas enzimas muestren una amplia especificidad de sustrato (Takeda, et al., 2012). Además, se ha determinado que estas enzimas presentan mayor afinidad por sustratos que presentan más aminoácidos que pentapéptidos (Terra, et al., 2009). Es así que se pueden emplear una variedad de sustratos, siendo la caseína (proteína genérica) y la gelatina (proteína específica derivada del colágeno) muy eficientes para evaluar su función proteolítica, debido a su gran cantidad de aminoácidos hidrolizables y aromáticos.

Actividad hemorrágica

Las metaloproteasas del veneno de serpientes son el principal factor considerado como hemorrágico. Se ha reportado que la actividad hemorrágica es mayor en las metaloproteasas de la clase PIII ya que estas son más potentes y presentan mayor diversidad en dicha función, comparado con las del tipo I que es muy baja, o en ocasiones carente de dicha actividad. La hemorragia producida por las metaloproteasas de la clase PIII puede ser tanto a nivel local como sistémico. En el presente trabajo se pudo obtener una enzima con alta acción hemorrágica debido a que se trataría de una metaloproteasa de la clase PIII, la cual fue evaluada solo a nivel local. Asimismo, se han podido aislar proteasas hemorrágicas de las serpientes *Bothrops atrox* (Sánchez, et al., 2010), *B. jararacá* (Paine, et al., 1992), *Crotralus atrox* (Fox, 1995), *B. jararacussu* (Mazzi, et al., 2004), *Bothrops leucurus* (Sánchez, et al., 2007) y esa capacidad hemorrágica se ha atribuido tanto a los dominios catalíticos como a los no catalíticos los cuales están presentes en las metaloproteasas de la clase PIII. El dominio similar a

desintegrina presente en este tipo de metaloproteasa, y que no se encuentra en las metaloproteasas de la clase PI, está altamente relacionada con la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno, lo cual ayudaría más al desarrollo de la hemorragia (Takeda, et al., 2012; Gutiérrez, et al., 2010). Es así que, se tiene que en muchas ocasiones la existencia de actividad proteolítica no demarca una acción hemorrágica directa, esto se puede observar en la enzima purificada que tiene actividad proteolítica baja, sin embargo, muestra actividad hemorrágica mayor en comparación con la enzima aislada por Cortéz (1997) que por el contrario carece de actividad hemorrágica, pero presenta actividad proteolítica mayor que la del presente estudio.

El DHM determinado para la metaloproteasa purificada fue de 0,226 µg, que representa 2,4 veces más que en el veneno crudo de *B. pictus* cuyo DHM fue de 0,535 µg. Asimismo, se ha encontrado que la metaloproteasa aislada de *B. jararacussu* tiene un DHM de 4 µg (Mazzi, et al., 2004) y en *B. brazili* se aisló una con un DHM de 6 µg (Isla, 2003). Además, existen trabajos previos que sugieren que la actividad hemorrágica del veneno crudo de *B. pictus*, empleando la dosis hemorrágica mínima (DHM) como valor de medición, es alta. Es así que, Rojas, et al., en el año 2005 determinó un DHM de 1,06 µg para la misma especie, determinándose que esta actividad hemorrágica es mayor que en *B. atrox* y *B. brazili*. Asimismo, podemos indicar que la diferencia entre los datos obtenidos en los DHMs para la misma especie en diferentes estudios (Rojas, et al., 2005; Olascoaga, 1987), se puede deber a factores como la edad y el sexo de los especímenes, que se ha visto que son factores que pueden afectar directamente la actividad proteolítica del veneno y por tanto, podrían variar también la actividad hemorrágica. Esta diferencia dentro de la misma especie para la misma proteína se ha evidenciado en varias especies, como *Bothrops jararacá* donde se han encontrado diferencias significativas en su actividad proteolítica sobre gelatina 2% entre especímenes machos y hembras lo cual estaría directamente relacionado con variaciones de las

metaloproteasas presentes en dichos venenos (Menezes, et al., 2006). Por otro lado, en un estudio realizado por Málaga en el año 2000 empleando especímenes de diferentes edades de la especie *B. atrox*, se mostró que la actividad proteolítica aumentó proporcionalmente con la edad, y se mostró una variación en la actividad hemorrágica siendo mayor la encontrada en especímenes juveniles de 2 años en comparación con especímenes de 1 año y adultos, asimismo en esta misma especie se realizó un perfil proteómico donde se evidenció la variación entre las metaloproteasas por ausencia y presencia de distintas bandas en geles de poliacrilamida 2D (Guércio, et al., 2006) y resultados similares se obtuvo con la especie *B. jararacá* (Antunes, et al., 2010).

Al parecer la localización del tejido y la degradación *in vivo* del colágeno son las principales causas que inducen la hemorragia. El colágeno de tipo IV es el que le confiere la estabilidad tanto bioquímica como estructural de la membrana basal, por lo que al alterarse puede dañar otros componentes de la membrana basal, produciéndose de esta manera la hemorragia (Baldo, et al., 2010; Moura-da-Silva y Baldo, 2012). Como se demostró la enzima purificada tiene actividad proteolítica sobre gelatina, la que se observó mediante la técnica de zimografía, por lo que esta acción estaría relacionada con la alta actividad hemorrágica mostrada por la enzima en un área local.

pH óptimo y estabilidad térmica

Las proteínas se caracterizan por ser moléculas que se desnaturalizan y desestabilizan con los cambios de temperatura y el pH. La temperatura es un factor importante para que una enzima mantenga su actividad, ya que al incrementar la temperatura la enzima cambia su conformación pasando de un estado nativo al estado desnaturalizado debido a que se desestabilizan las interacciones electrostáticas y las de Van der Waals. La composición aminoacídica de la proteína también es determinante en la estabilización

de la enzima a altas temperaturas. Es así que, los aminoácidos hidrófobos dan mayor estabilidad a la enzima a diferencia de los aminoácidos hidrófilos. Además, cuando menor peso molecular muestre una proteína y mayor sea la cantidad de enlaces disulfuro, la proteína es más termoestable.

En el caso de la proteína en estudio, se observó que su mayor actividad se encuentra a los 37 °C, la cual es una temperatura moderada y corresponde a la temperatura corporal humana y de otros mamíferos, lo que permite que la actividad enzimática sea la adecuada y no se desnaturalice cuando se encuentra en el organismo. Por otro lado, se pudo observar actividad enzimática de hasta el 30% a una temperatura de 55 °C, lo cual indicaría que la metaloproteasa aislada es estable hasta dicha temperatura.

Resultados similares se han obtenido con dos proteasas aisladas del veneno de la especie *L. muta* en: una fibrinogenasa (Escobar et al., 1992) que tolera temperaturas de hasta 65 °C y la proteinasa I (Rodríguez y Yarlequé, 1991) que muestra un 100% de estabilidad a 37 °C, permaneciendo estable a los 45 °C (107%) y la actividad baja a un 96% a los 70 °C. Además, en el veneno de *Cerastes cerastes* se aislado una fibrinogenasa estable hasta los 55 °C (Daoud et al., 1987).

En el género *Bothrops*, se han aislado distintas melaproteasas termoestables de diferentes especies. En *B. bilineatus*, se aisló una metaloproteasa que mostró una reducción del 30% y 85% a temperaturas de 45 °C y 60 °C, respectivamente (Escobar, 1996). Por su parte, Azañero en el año 2000 evaluó la termoestabilidad de una metaloproteasa aislada del veneno de *B. brazili*, empleando ensayos de digestión de fibrinógeno. En este trabajo se mostró que la enzima es termoestable hasta los 45 °C y se inactiva a partir de los 55 °C. En otro trabajo, empleando la misma enzima de *B. brazili*, Isla (2003) pudo encontrar que la actividad hemorrágica empleando ratones se redujo en aproximadamente un 50% cuando se incubó la enzima a 50 °C por 10 minutos, y a temperaturas de 60 °C y 70 °C la actividad fue anulada. En otras especies como *B.*

atrox, la atroxina (Pantigoso, 1996) se muestra estable en el rango de 40 °C a 45 °C y en *B. pictus*, la fibrinogenasa aislada por Cortez, (1997) muestra actividad proteolítica hasta los 55 °C y pierde su acción a los 65 °C.

En algunas metaloproteasas de venenos de serpientes se ha observado que en el dominio rico en cisteína se tiene la presencia de 12 cisteínas y en el dominio similar a desintegrina 16 cisteínas de forma conservada (Jia, et al., 1996; Calvete, et al., 2000), tal como se ha encontrado en la metaloproteasa hemorrágica HRB1 aislada del veneno de *T. flavoviridis* (Takeya et al., 1990) y en la Castrocolastatina C una proteína similar a desintegrina/rica en cisteína aislada del veneno de la serpiente *C. atrox* (Calvete, et al., 2000; Shimokawa, et al., 1997). Conociendo que el peso molecular de la enzima aislada en el presente estudio corresponde a 62 kDa, es decir es de alto peso molecular, se podría indicar que la proteína en estudio presenta varios enlaces disulfuros que le confieren la mencionada estabilidad térmica hasta los 55 °C.

Por otro lado, otro factor importante que afecta la estabilidad de la enzima es el pH, ya que en las SVMs se ha observado que el pH óptimo, que es el pH en donde la actividad enzimática es máxima y la enzima es soluble, se encuentra en el rango del pH neutro a básico (Ramos, et al., 2006; Xu et al., 2004). La metaloproteasa aislada en el presente estudio tiene un pH óptimo de 7,5 que es un pH ligeramente básico, asimismo se mostró estable desde un pH de 7 hasta pH 9 que es más básico. Por lo que, esta enzima mostraría una elevada actividad cuando se encuentre en la sangre permitiendo así la degradación de las proteínas plasmáticas, fibrinógeno, entre otras.

Pantigoso, et al., (1996) demostró que la atroxina aislada de *B. atrox* tiene un pH de 7,4. La metaloproteasa aislada de *B. brazili* mostró un pH de 7, neutro, cuando se evaluó la actividad hemorrágica en ratones, la cual se mantuvo estable por aproximadamente 6 semanas a temperatura ambiente.

Existen otras serpientes del mismo género en las cuales se ha encontrado que el pH óptimo es ligeramente más básico, como en la proteasa aislada del veneno de *B. bilineatus* (Escobar, 1996) que mostró un pH óptimo de 8,0 y en la proteinasa I extraída del veneno de *L. muta* (Rodríguez y Yarlequé, 1991) tiene un pH óptimo de 8,4. Casos más extremos es el que se observa en la enzima Acutolisina A, una metaloproteasa PI aislada del veneno de *Agkistrodon acutus*, muestra un pH óptimo de 10 y por otro lado, exhibe una disminución de 100 veces la actividad proteolítica cuando el pH está en el rango de 5 a 7,5 (Zhu et al., 1997), es decir incluyendo pHs cercanos al neutro y ligeramente básicos.

Las metaloproteasas al igual que otras enzimas van a disminuir su actividad enzimática mientras más se alejan de su pH óptimo. El pH óptimo, al igual que la estabilidad a los cambios de temperatura también va a depender de la cargas de los aminoácidos, ya que el cambio de estas cargas va a producir un cambio en la conformación de la proteína de tal manera que se inactivan de forma reversible los centros activos o centros catalíticos.

Efectos de algunos activadores e inhibidores enzimáticos

La enzima del presente estudio mostró una disminución de más del 50% empleando el agente quelante EDTA que es el principal inhibidor de la actividad enzimática de metaloproteasas ya que retira los cationes divalentes impidiendo así que estos iones activen su actividad proteolítica. Asimismo, la acción de este quelante puede inducir algún tipo de cambio conformacional conduciendo a una enzima a inactivarse por remoción de los cationes divalentes como el Zn^{+2} (Bjarnason y Fox, T; Ramos, et al., 2006). Este tipo de cambio conformacional se pudo observar en la acutolisina D cuando fue incubada con EDTA y otros agentes quelantes, en donde se observó que la enzima adoptó una estructura intermedia no funcional por la carencia de sus iones Ca^{2+} y Zn^{2+}

(Xu, et al., 2004). En la toxina hemorrágica HT-e aislada de *C. atrox* se encontró que la remoción de los iones Zn^{2+} conducen a una pérdida del 95% de la actividad proteolítica (Bjarnason y Tu, 1994), en la leucurolisina-B aislada de *B. leucurus* se obtuvo una inhibición de la actividad 97% empleando el agente quelante EDTA (Sánchez, et al., 2007) y en la atroxlisina aislada del veneno de *B. atrox* dicha inhibición fue total (Sánchez, et al., 2010).

Otros agentes empleados para inhibir la actividad enzimática son los agentes reductores como el 2 β -mercaptoetanol y el DTT. La enzima purificada fue inhibida aproximadamente a un 68% cuando fue incubada con estos agentes reductores, lo cual indica que dicha enzima muestra residuos cisteínas unidos por puentes disulfuro. Sin embargo, esta disminución es pequeña comparada con otras enzimas como la obtenida con la atroxlisina y la leucurolisina-B en donde se observó que la actividad enzimática de dichas enzimas se inhibieron en un 100% cuando fueron incubadas con DTT (Sánchez, et al., 2007, 2010). Estos resultados nos muestran la presencia de varios puentes disulfuro, ya que solo algunos logran ser reducidos con la concentración empleada de 5 mM de 2 β -mercaptoetanol y DTT.

Existen activadores de metaloproteasas que en su mayoría son cationes divalentes ya que estos pueden unirse a los centros catalíticos y son necesarios para que la enzima tenga su actividad adecuada. Los cationes divalentes activadores de la mayoría de las metaloproteasas son el Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En este estudio la enzima solo aumentó su actividad a un 102% y 112% cuando se la incubó con Zn^{2+} y Mg^{2+} 5 mM, respectivamente. Mientras que con el Ca^{2+} 5 mM la actividad se mantuvo en un 95%.

En la proteasa HT-e se observó que luego que la actividad proteolítica fue inhibida con EDTA la actividad fue recuperada en un 20% cuando se dializó con una solución de

Zn^{2+} (Bjarnason y Tu, 1994; Xu, et al., 2004), caso similar es el obtenido con *L. muta* en donde la actividad de la proteasa aislada por Escobar (1992) pudo ser restituida con Zn^{2+} luego de ser incubada con EDTA, lo que indica que el Zn^{2+} es necesario para que se mantenga la actividad enzimática. Resultados opuestos se han obtenido con la atroxilisina y la leucurolisina-B los cuales al contrario de lo obtenido en el presente estudio, sus actividades enzimáticas fueron inhibidas cuando la enzima se incubó con Zn^{2+} , esto pudo deberse a la concentración empleada de dicho catión ya que en altas concentraciones se puede observar una unión de dicho catión a sus sitios alostéricos de tal manera que se produce un cambio conformacional que hace que la enzima sea inhibida (Sánchez, et al., 2010).

Por otro lado, en este estudio el Ca^{2+} no causó ningún efecto tal como se observó en la acutolisina D de *A. acutus*, indicándose que este ion no es esencial para la actividad proteolíticas de dichas enzimas. En cambio, en otras proteasas aisladas se encontró que la actividad proteolítica incrementó cuando se incubó la enzima con iones Ca^{2+} , por ejemplo en la leucurolisina-a de *B. leucurus* (Bello, et al., 2006)

Antigenicidad y Neutralización

Para poder producir un antiveneno que sea efectivo se debe evaluar la antigenicidad tanto del veneno completo como de sus componentes que ocasionen los principales efectos de envenenamiento, para que de esta forma se puedan contrarrestar dichos efectos en dosis reducidas. Debido a que las metaloproteasas son los principales factores proteolíticos y hemorrágicos este debe ser uno de los componentes del veneno que debe ser reconocido por el antiveneno. En la especie *B. pictus*, pudimos encontrar que la metaloproteasa aislada en el presente estudio mostró una sola banda de reconocimiento en la placa de inmunodifusión, lo que indicaría que el antiveneno comercial reconoce a

la enzima purificada, es decir que dicha enzima es altamente antigénica (Fig. 10). Otra metaloproteasa que también es altamente antigénica es la aislada del veneno de *B. brazili* con la cual también se obtuvo una banda de precipitina empleando el mismo antiveneno comercial de origen equino (Isla, 2003).

En cuanto a la neutralización de la enzima, indicamos que se emplearon 5 DHMs para evaluar la neutralización similar a lo realizado por Rojas, et al., (2005), esto con el fin de poder obtener un halo lo suficientemente visible para observar la inhibición. En este trabajo, la actividad hemorrágica probada en ratones fue inhibida al 100% aplicando ½, 1 y 2 dosis del suero botrópico polivalente calentado a 37 °C por una hora. Dicha inhibición es similar al resultado obtenido por Yarlequé, et al., (2008) en cuyo trabajo se indica que la actividad proteolítica sobre caseína del veneno crudo de *B. pictus* es inhibida en 80% con ½ dosis, 89% con 1 dosis y 93% con 2 dosis, es decir se obtiene una inhibición casi total de esta actividad.

Este resultado indica claramente que este antiveneno es efectivo para la neutralización de esta enzima la cual produce los efectos hemorrágicos, lo cual se corrobora con un estudio realizado por Laing, et al., en el 2004 quienes probaron que la actividad hemorrágica, que está principalmente relacionada con las metaloproteasas, pudo ser inhibida tanto por el antiveneno botrópico polivalente de Perú como por los antivenenos producidos en Colombia y Brasil en el veneno crudo de *B. pictus*.

CONCLUSIONES

1. El veneno de la serpiente *Bothrops pictus* contiene una metaloproteasa que se pudo aislar en dos pasos cromatográficos empleando una columna de Sephadex G-75, seguida por una columna de DEAE Sephadex A-50 a pH 5.
2. La enzima purificada es una metaloproteasa ácida de alto peso molecular (62 kDa) en los venenos ofídicos.
3. La enzima purificada tiene un pH óptimo de 7,5 y posee estabilidad térmica hasta los 55 °C.
4. La enzima es fuertemente inhibida por el agente quelante EDTA y moderadamente inhibida por los agentes reductores 2β-mercaptoetanol y DTT.
5. La enzima purificada tiene actividad proteolítica 1,8 veces mayor que la del veneno crudo y una DHM de 0,226μg que es 2,4 veces mayor que la del veneno crudo de *B. pictus*.
6. La metaloproteasa aislada es reconocida por el antiveneno comercial producido por el INS y su actividad proteolítica es neutralizada por dicho antiveneno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, T., Yamashita, K., Barbaro, K., Saiki, M. y Santoro, M. 2010. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56: 1443-1458.
- Ascencios, H. y Cutti, F. 1995. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú. *Boletín de Lima*, N° 97, pp. 91-96.
- Azañero, A., Escobar, E y Yarlequé, A. 2000. Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Revista Peruana de Biología*, 7(1): 67-73.
- Bailey, G., Tu, A., Sapru, Z. 1988. A fibrinolytic enzyme from the venom of the Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Hemostasis and Animal Venoms*, 15: 203-211.
- Baldo, C., Jamora, C., Jamanouye, N., Zorn, T., Moura-da-Silva, A. 2010. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4(6): 727.
- Bello, C., Hermogenes, A., Magalhaes, A., Veiga, S., Gremski, L., Richardson, M., Sanchez, E. 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus*(white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*, 88: 189-200.
- Bernardes, C., Santos-Filho, N., Costa R., Gomes, M., Torres, F., Costa, J., Borges, M., Richardson, M., dos Santos, D., de Castro Pimenta, A., Homsí-Brandeburgo, M., Soares, A., Oliveira, F. 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 51: 574-584.

- Bjarnason, J. y Tu, A. 1978. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry*, 17(16): 3395-3404.
- Bjarnason, J. y Fox, J. 1983. Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin e, a zinc protease isolated from the venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Biochemistry*, 22: 3770-3778.
- Bjarnason, J. y Fox, J. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*, 62: 325-372.
- Calderon, L., Sobrinho, J., Zaqueo, K., De Moura, A., Grabner, A., Mazzi, M., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C., Zuliani, P., Carvalho, B., Da Silva, S., Stábili, R., y Soares, A. 2014. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 203639, 19 pages.
- Calvete, J., Moreno-Murciano M., Sanz, L., Jürgens, M., Schrader, M., Raida, M., Benjamin, D., y Fox, J. 2000. The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like0cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom. *Protein Science*, 9: 1365-1373.
- Cárdenas, J. 1993. Estudio proteico y enzimático en el veneno de tres especies de serpientes mantenidas en cautiverio. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. UNAS Arequipa- Perú.
- Chippaux, J.; Williams, V. and White, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29: 1279-1303.
- Cintra, A., De Toni, L., Sartim, M., Franco, J., Caetano, R., Murakami, M., Sampaio, S. 2012. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, 60: 70-82.
- Cortéz, R. 1997. Aislamiento, propiedades bioquímicas y acción fibrinogenolítica de una proteasa del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* "jergón de la costa". Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. UNMSM. Lima-Perú.

- Daoud, E., Halim, H., Shaban, E., el Asmar, M. 1987. Further characterization of the anticoagulant proteinase, cerastase F-4 from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. *Toxicon*, 25(8): 891-897.
- Deutsch, H., Diniz, C. 1955. Some proteolytic activities of snake venoms. *Journal of Biological Chemistry*, 216: 17-26.
- Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A. y Gutierrez, J. 2000. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Pharmacology*, 60: 269-274.
- Escobar E. 1992. Purificación y caracterización bioquímica de una enzima fibrinogenolítica del veneno de la serpiente *Lacheis muta*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú.
- Escobar, E.; Cardenas, J. y A. Yarlequé. 1994. Caracterización parcial de una fosfolipasa A del veneno de *Bothrops pictus*. Libro Resúmenes IV Reunión Científica ICBAR. UNMSM, pp. 56.
- Evans, H. 1984. Purification and properties of a fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 802(1): 49-54.
- Fernandes, C., Zamuner, S., Zuliani, J., Rucavado, A., Gutierrez, J. y Teixeira, C. 2006. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*, 47: 549-559.
- Fox, J. y Bjarnason, J. 1995. Atrolysins: Metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods in Enzymology*, 248: 368-87.
- Fox, J. y Serrano, S. 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinases (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*, 275:3016-3030.

- Fox, J y Serrano, S. 2010. Snake Venom Metalloproteinases. En: MACKESSY, Stephen. Handbook of Venoms and toxins of reptiles. Florida: CRC Press, pp.95-113.
- Gremski, L., Chaim, O., Paludo, K., Sade, Y., Otuki, M., Richardson, M., Gremski, W., Sanchez, E., Veiga, E. 2007. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*, 50: 120–134
- Guércio, R., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Lopez-Lozano, J., Paba, J., Sousa, M., y Ricart, C. 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science*, 4:11.
- Gutierrez, J., Romero, M., Diaz, C., Borkow, G y Ovadia, M. 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 33:19–29.
- Gutiérrez, J., Rucavado, A. y Escalante, T. 2010. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. En: MACKESSY, Stephen. Handbook of Venoms and toxins of reptiles. Florida: CRC Press, pp. 115-138.
- Hite, L., Shannon, J., Bjarnason, J. y Fox, J. 1992. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: Evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry*, 31: 6203-6211.
- Isla, M., Málaga, O. y Yarlequé, A. 2003. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales de la Facultad de Medicina-UNMSM*. Vol. 64 N°3, pp. 159-166.
- Iwanaga, S., Omori, T., Oshima, G., Suzuki, T. 1965. Studies of snake venoms. *The Journal of Chemistry*, 57: 3.
- Jia, L., Shimokawa, K., Bjarnason, J., Fox, J. 1996. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, 34:1269–1276.

- Kamiguti, A. 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 45: 1041-1049.
- Koh, D., Armugam, A. y Jeyaseelan, K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(24): 3030-3041.
- Kohlhoff, M., Borges, M., Yarleque, A., Cabezas, C., Richardson, M., Sanchez, E. 2012. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of Proteomics* 3, 75(7): 2181-95.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikesawa, M., Muta, R. y Ohsaka, A. 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 13: 43.
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 226:680-684.
- Laing GD, Yarleque A, Marcelo A, Rodriguez E, Warrell DA and Theakston RDG. 2004. Preclinical testing of three South American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms. *Toxicon*, 44: 103-106.
- Laing, G. y Moura da Silva, A. 2005. Jararhagin and multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, 45: 987-996.
- Lama, J. Ofidismo en 4 hospitales de Lima. Estudio retrospectivo de la casuística de 4 hospitales generales de Lima Perú: 1970-1990. Tesis de Bachiller en Medicina. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima-Perú, 1991.
- Liu, Q., Xu, W., Cheng, X., Jin, G., Shen, X., Lou, H. y Liu, J. 1999. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding haemorrhagic toxin acutolysin A from *Agkistrodon acutus*. *Toxicon*, 37:1539-1548.
- Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. 1985. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Boletín de la Sociedad de Química del Perú*, 52(3):151-63.

- López-Lozano, J., de Sousa, M., Ricart, C., Chávez-Olortegui, C., Sanchez, E., Muniz, E., Bührnheim, P. y Morhy, L. 2002. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon*, 40(7):997-1006.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193: 165-275.
- Maeno, H., Mitsunashi S., Sato R. 1960. Studies on Habu snake venom. 2c. Studies on H beta-proteinase of Habu venom. *Japanese Journal of Microbiology*, 4:173-180.
- Maguiña, C., Henríquez, C., Ilquimiche, L., Mostorino, R., Gotuzzo, E., Legua, P., Echevarría, J. y Seas, C. 1998. Ofidismo por *Bothrops pictus* en el Hospital Nacional Cayetano Heredia: Estudio prospectivo de 23 casos. *Folia Dermatológica Peruana* - Vol. 9 Nº.1-2.
- Málaga, O., Cárdenas, J., Cutti, F., Pantigoso, C., Morante, Y., Ascencios, H. y Yarlequé, A. y Severino, R. 1993. Comportamiento de serpientes venenosas en cautiverio. Libro de resúmenes III Reunión Científica del ICBAR. UNMSM. pp.31.
- Mandelbaum, F., Reichel, A. y Assakura, M. 1982. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca) *Toxicon*, 20(6):955-972.
- Markland, F. y Swenson, S. 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62:3-18.
- Mazzi, M., Marcussi, S., Carlos, G., Stábeli, R., Franco, J., Ticli, F., Cintra, A., França, S., Soares, A., Sampaio, S. 2004. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*, 44: 215-223.
- Mendoza, J., Lazo, F., Yarlequé, L., Ruiz, N., Yarlequé, A., Pessah, S., Flores, V. y Bonilla, C. 2008. Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades defosfolipasa a2, l-aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(2):174-78.

- Menezes, M., Furtado, M., Travaglia-Cardoso, S., Camargo, A., Serrano, S. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*, 47(3): 304–312.
- Mesia, M., Lazo, F. y Yarlequé, A. 2011. Purificación y caracterización de un nuevo principio coagulante del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus*. *Revista de la Sociedad de Química del Perú*, 77(3):182-190.
- Michelson, A. 2010. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, 9: 154-169.
- Minea, R., Swenson, S., Costa, F., Chen, T., Markland, F. 2005. Development of a novel recombinant disintegrin, contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 34: 177–183.
- Miyata, T., Takeya H., Ozeki Y., Arakawa M., Tokunaga F., Iwanaga S. 1989. Primary structure of hemorrhagic protein, HR2a, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Journal of Biochemistry*, 105: 847–53.
- Moura-da-Silva, A. y Baldo, C. 2012. Jararhagin a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 60: 280-289.
- Ohsaka A. 1960. Fractionation of habu snake venom by chromatography on CM-cellulose with special reference to biological activities. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 13:199–205.
- Okonogi, 1960 Okonogi T, Hoshi S, Honma M, Mitsuhashi S, Maeno H, Sawai Y. 1960. Studies on the Habu snake venom. 3-2. A comparative study of histopathological changes caused by crude venom, purified Habu-proteinase and other proteinases. *Journal Microbiology*, 4:189–92.
- Olascoaga, M. 1987. Estudio del veneno de *Bothrops pictus*. Bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con Mención en Genética. UNMSM. Lima-Perú.

- Omori, T., Mizushima T., Sato T., Satake M., Iwanaga S., Suzuki T. 1962. Toxic action of mamushi venom with special reference to hemorrhage. *Nisin Igaku*, 49: 770–774.
- Otero, R., Gutierrez, J., Mesa, M., Duque, E., Rodriguez, O., Arang, J., Gomez, F., Toro, A., Cano, F., Rodriguez, L., Caro, E., Martinez, J., Cornejo, W., Gómez, L., Uribe, F., Cardenas, S., Nuñez, V. y Díaz, A. 2002. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40: 1107–1114.
- Ouchterlony, O. y Nilsson, L. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of immunological methods*, Vol. 1: *Immunochemistry*. BlackwellScientific Publications, Oxford, 1 9:1.
- Paine, M., Desmondtg, H., Theakston, R. y Crampton, J. 1992. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32): 22869-22876.
- Pandya, B. y Budzgnski, A. 1984. Anticoagulant proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochemistry*, 23(3): 460–470.
- Pantigoso, C., Escobar, E., Málaga, O. y Yarlequé, A. 1996. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinaza del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* «jergón». *Acta Científica Venezolana*, 47: 67-73.
- Perú. Lista de especies amenazadas de fauna silvestre, del Decreto Supremo N° 034-2004-AG. *El Peruano*, 22 de septiembre del 2004, pp.276853-276856.
- Porges, N. 1953. Snake Venoms, their biochemistry and mode of action. *Science*, 117 (3029): 47-51.
- Ramos, O., y Selistre-de-Araujo, H. 2006. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142: 328–346.

- Rodríguez, E. y Yarlequé, A. 1991. Aislamiento y algunas propiedades de la Proteinasa I del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Acta Científica Venezolana, 42: 219-225.
- Rodrigues, V., Soares, A., Guerra-Sá, R, Rodrigues, V., Fontes, M., Giglio, J. 2000. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, 381(2): 213-224.
- Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G. y Gutiérrez, J. 2005. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. Acta Tropical, 93: 85-95.
- Sánchez, E., Gabriel, L., Gontijo, S., Gremski, L., Veiga, S., Evangelista, K. Eble, J., Richardson, M. 2007. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, 468: 193-204.
- Sanchez, E., Schneider, F., Yarleque, A., Borges, M., Richardson, M., Figueiredo, S., Evangelista, K., Eble, J. 2010. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. Archives of Biochemistry and Biophysics, 496: 9-20.
- Shannon, J., Baramova, E., Bjarnason, J. y Fox, J. 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. Journal of Biological Chemistry, 264:11575-11583.
- Shimokawa, K., Shannon, J., Jia, L., y Fox, J. 1997. Sequence and Biological Activity of Catrocollastatin-C: A Disintegrin-Like/Cysteine-Rich Two-Domain Protein from *Crotalus atrox* Venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, 343(1): 35-43.
- Stroka, A., Donato, J., Bon, C., Hyslop, S., Lobo de Araujo, A. 2005. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. Toxicon, 45: 411-420.

- Takahashi, T., Ohsaka, A. 1970. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 198(2): 293-307.
- Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S. 2012. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 164-176
- Takeya, H., Oda, K., Miyata, T., Omori-Satoh, T. y Iwanaga, S. 1990. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 16068-16073.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F. 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, 54: 988-997.
- Terra, R., Pinto, A., Guimaraes, J., Fox, J. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. *Toxicon*, 54 (6): 836-844.
- Tschudi, V. 1845. Reptilium conspectus quae in Republica Peruana reperiuntur et pleraque vel collecta sunt in itinere. *Archiv für Naturgeschichte*, 11: 150-170.
- Warburg O, Christian W. 1941. Isolation and crystallization of the glycolytic enzyme enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 31, pp 384-421.
- Warrell, D. 1996. Clinical features of envenoming from snake bites. *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Merieux, Lyon, pp. 63-76.
- Xu, X., Liu, X., Wu, B., Liu, Y., Liu, W., Xie, Y., Liu, Q. 2004. Metal-Ion- and pH-Induced Conformational Changes of Acutolysin D from *Agkistrodon acutus* Venom Probed by Fluorescent Spectroscopy. *Biopolymers*, 74: 336-344.
- Yarlequé, A., Vivas, D., Inga, R., Rodríguez, E., Sandoval, G., Pessah, S. y Bonilla, C. 2008. Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas

presentes en los venenos de serpientes peruanas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 25(2):169-73.

- Yarlequé M., Ortíz C., Morante Y., y Yarlequé A. 2012. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. Revista Sociedad de Química del Perú, 78 (1): 27-36.
- Zhu, Z., Gong, W., Zhu, X., Teng, M., Niu, L. 1997. Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agkistrodon acutus*. Toxicon, 35 (2): 283- 292.

FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1

Bothrops pictus

"Jergón de la Costa"



FIGURA 2

PRIMER PASO DE PURIFICACIÓN EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR SEPHADEX G-75.

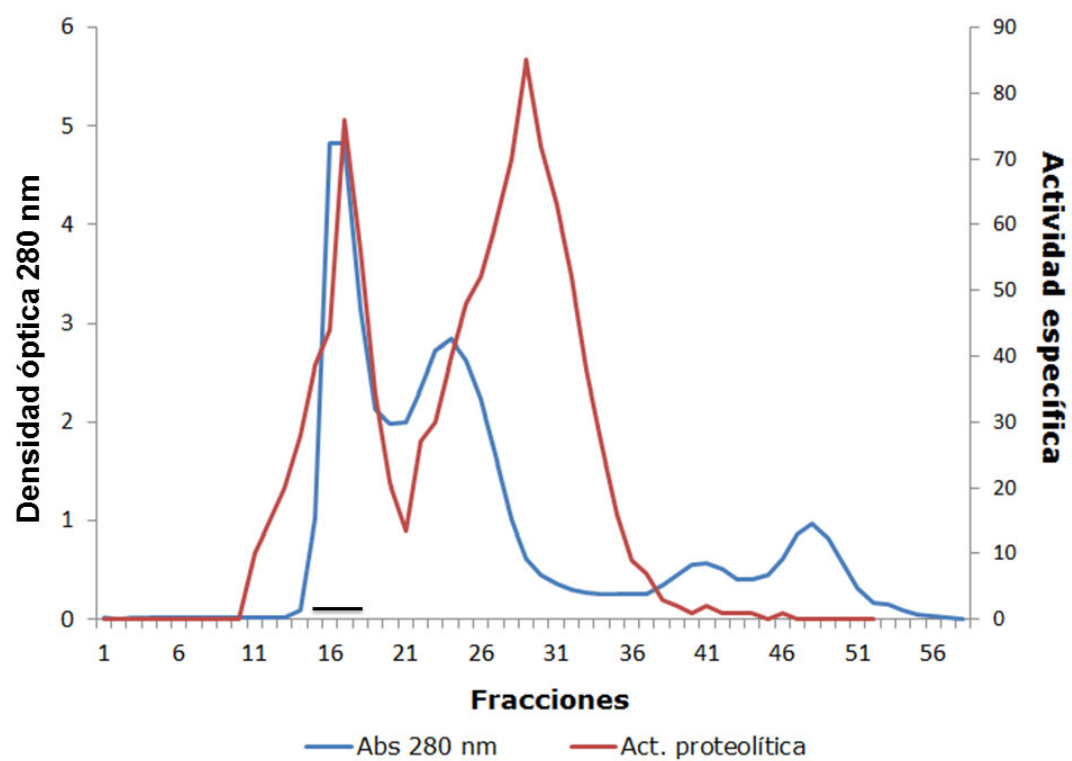


FIGURA 3

SEGUNDO PASO DE PURIFICACIÓN EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DEAE SEPHADEX A-50.

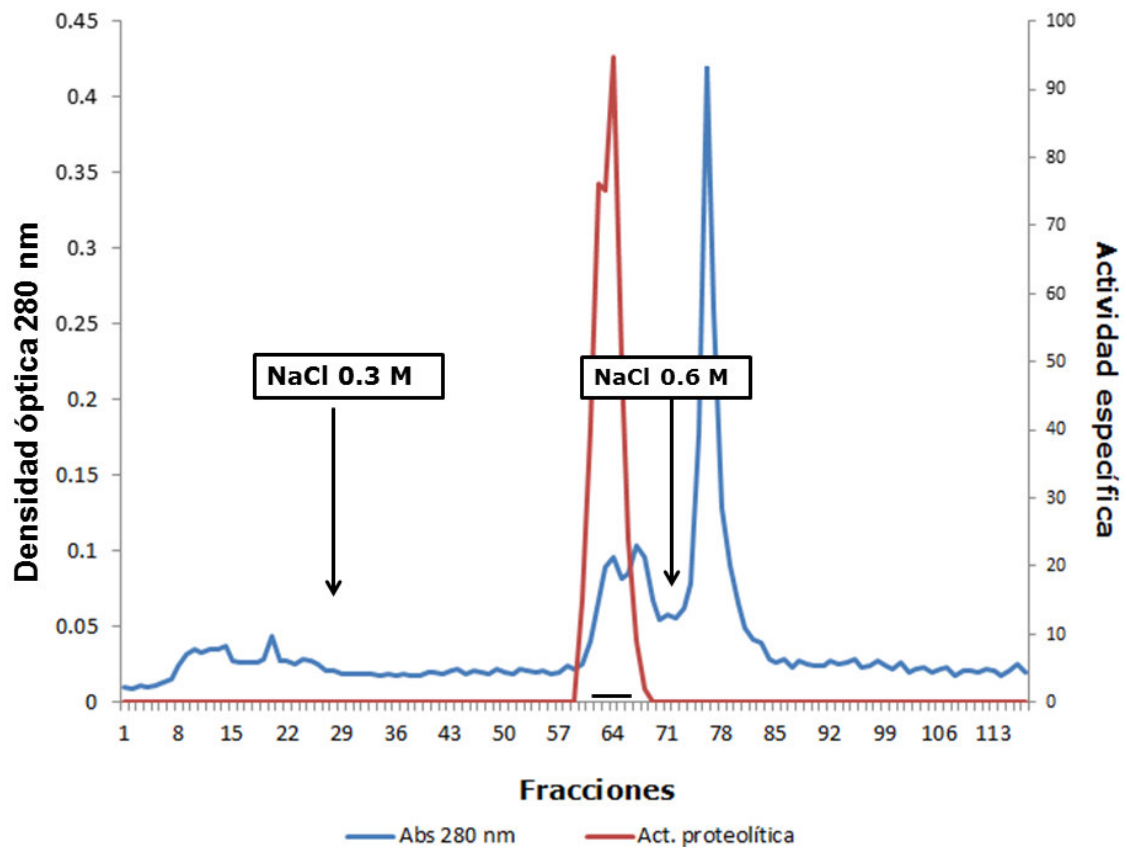


TABLA 1

PURIFICACIÓN DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO DE
Bothrops pictus.

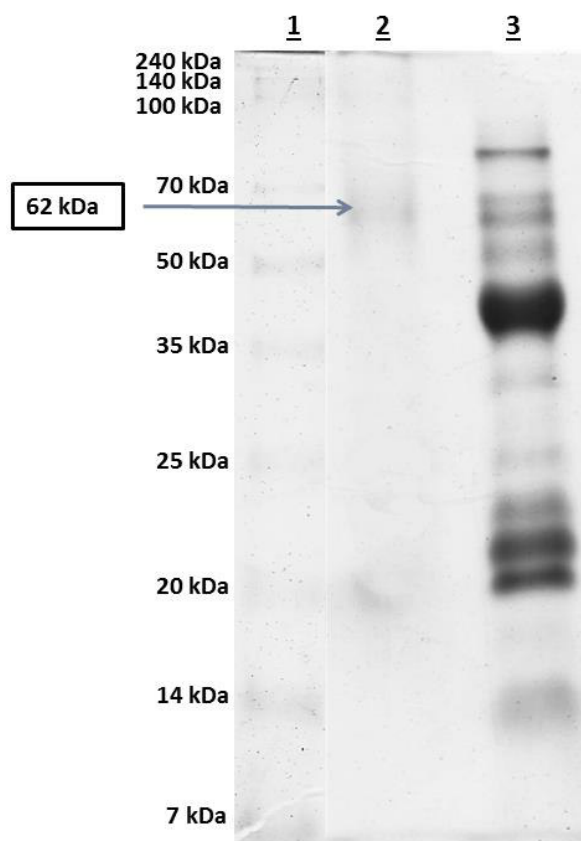
MUESTRA	CANTIDAD DE PROTEÍNA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA	U.T.A	RENDIMIENTO (%)	PURIFICACIÓN
	mg	%				
Veneno crudo	47.5	100	42.78	2031.8	100	1
Sephadex G-75	13.82	29.09	53.71	742.2	36.53	1.26
DEAE Sephadex A-50	0.34	0.71	74.1	24.8	1.22	1.73

Actividad específica: μg de L-tirosina / mg de proteína.

U.T.A. Unidades totales de actividad.

FIGURA 4

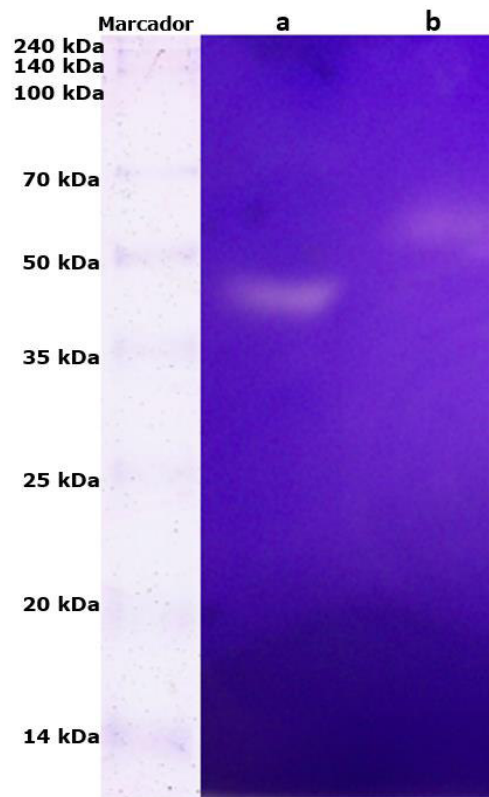
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS) AL 10% DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA.



1. Marcador de peso molecular de 7 a 240 kDa: Wide-View TM Prestained Protein Size Marker II (Wako).
2. Metaloproteasa hemorrágica en condiciones no reductoras (62 kDa).
3. Veneno total de *Bothrops pictus*.

FIGURA 5

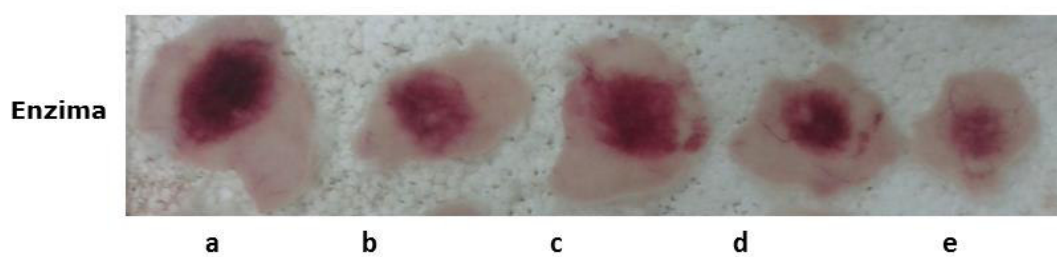
ZIMOGRAMA SOBRE GELATINA AL 2% DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*.



- a) Metaloproteasa hemorrágica (62 kDa).
- b) Veneno total de *Bothrops pictus*.

FIGURA 6.

ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*.



Actividad hemorrágica obtenida con: a) 2 μg , b) 1 μg , c) 0,5 μg , d) 0,25 μg y e) 0,125 μg de enzima purificada.

FIGURA 7

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM) DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*

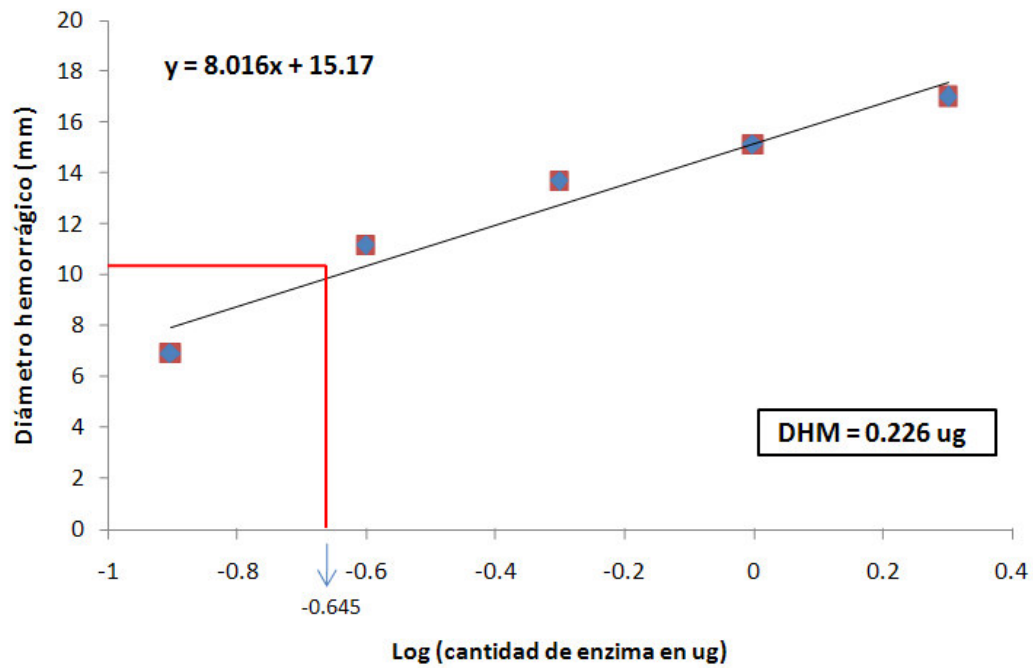


TABLA 2

EFFECTO DE INHIBIDORES Y ACTIVADORES SOBRE LA METALOPROTEASA AISLADA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops pictus*.

AGENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (%)
Control		100
Zn ²⁺	5 mM	102.8
Mg ²⁺	5 Mm	112
Ca ²⁺	5 mM	95
EDTA	5 mM	45.29
2β-Mercaptoetanol	5 mM	67.4
DTT	5 mM	69.2

FIGURA 8

EFFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA METALOPROTEASA
HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*.

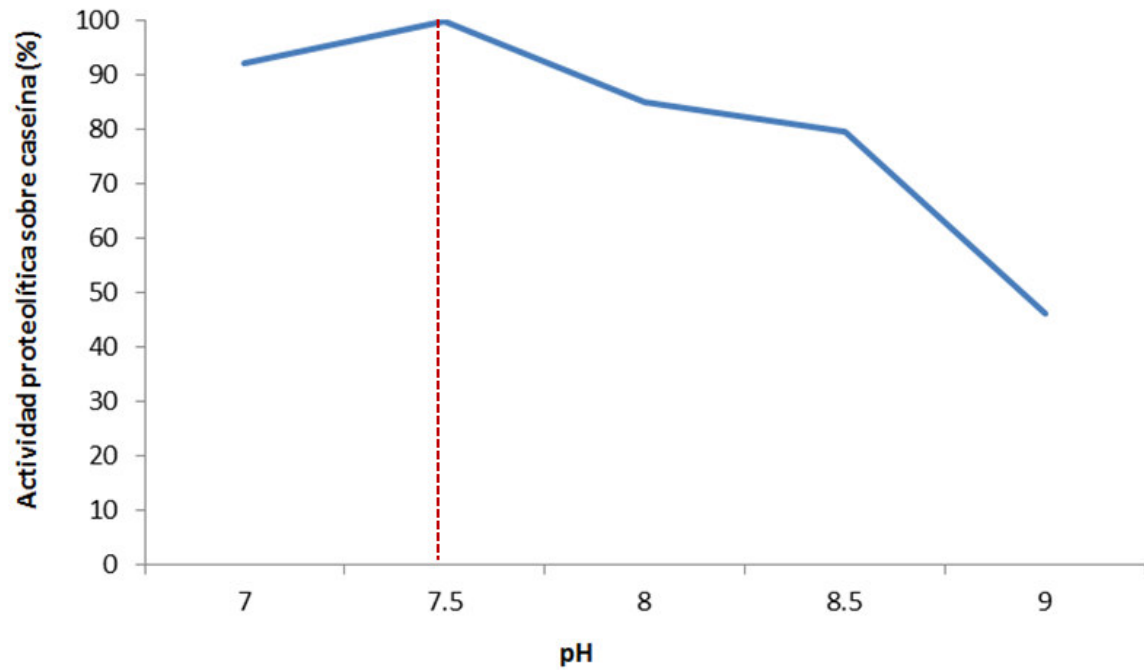


FIGURA 9

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA METALOPROTEASA AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*.

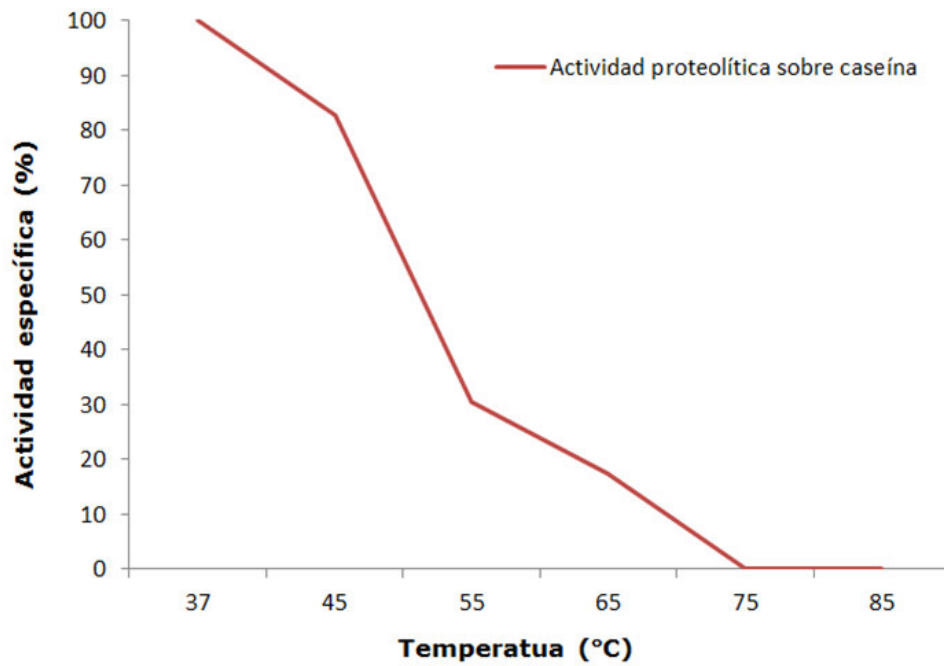
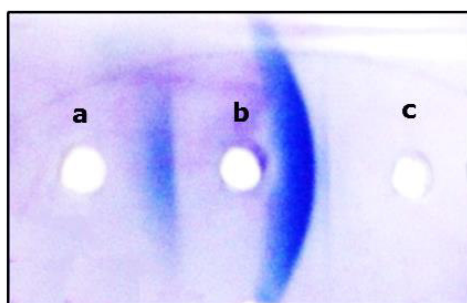


FIGURA 10

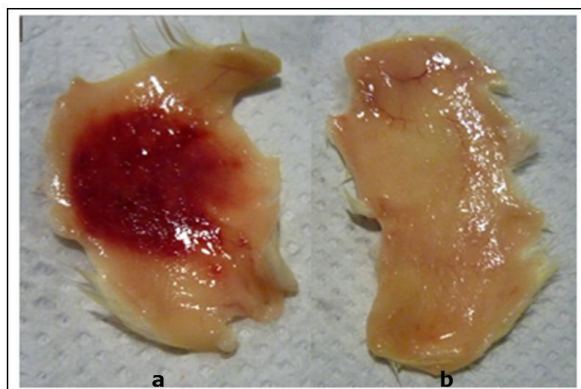
ANTIGENICIDAD DE LA METALOPROTEASA HEMORRÁGICA AISLADA DEL VENENO
DE *Bothrops pictus*



- a) Metaloproteasa hemorrágica aislada.
- b) Suero antibotrópico polivalente
- c) Veneno de *Bothrops pictus*

Figura 11

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DE LA METALOPROTEASA
AISLADA DEL VENENO DE *Bothrops pictus*.



- a) Hemorragia producida por la enzima purificada (0.0112 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- b) Neutralización con $\frac{1}{2}$ dosis de suero botrópico polivalente